

8-1

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-161353

(43)Date of publication of application : 19.06.2001

(51)Int.CI.

C12N 5/06
A61F 9/007

(21)Application number : 11-349705

(71)Applicant : JAPAN OPHTHALMIC
CONSULTANTS:KK

(22)Date of filing : 09.12.1999

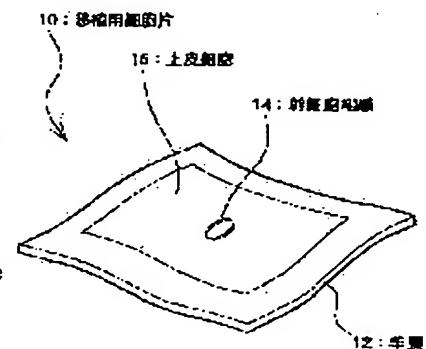
(72)Inventor : SHIMAZAKI JUN
TSUBOTA KAZUO

(54) CELL PIECE FOR TRANSPLANTATION AND METHOD FOR PREPARING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a cell piece for transplantation having a high reconstruction ratio of an epithelium and to provide a method for preparing the cell piece.

SOLUTION: This cell piece 10 for transplantation comprises an amnion 12, an epithelial stem cell tissue 14 made to adhere onto the amnion 12 and an epithelial cell 16 proliferated from the stem cell tissue so as to cover the amnion surface. The method for preparing the cell piece 10 for the transplantation comprises fixing the amnion 12 on a dish plate, bonding the epithelial stem cell tissue 14 onto the amnion 12, carrying out the culturing in this state, proliferating the epithelial cell 16 from the stem cell tissue 14 by the culturing, covering the surface of the amnion 12 with the epithelial cell 16 and thereby creating the cell piece 10 for the transplantation comprising the epithelial stem cell tissue 14 adhering to the surface of the amnion 12 and having the surface further covered with the proliferated epithelial cell 16.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS**[Claim(s)]**

[Claim 1] The piece for transplantation containing the amnion by which the sponge layer and the epithelium layer were removed, the epithelium stem cell tissue to which the front face of said amnion adhered, and the epithelial cell proliferated by in vitro one so that this amnion front face might be covered from said stem cell tissue of a cell.

[Claim 2] The piece for transplantation according to claim 1 of a cell to which said epithelial cell is characterized by being a cornea epithelial cell or a conjunctiva epithelial cell.

[Claim 3] The creation approach of the piece for transplantation of a cell which has the process which adjusts the amnion from which the sponge layer and the epithelium layer were removed, the process which makes epithelium stem cell tissue adhere to said amnion, and the process which proliferates this epithelial cell on said amnion.

[Claim 4] The creation approach of the piece for transplantation according to claim 3 of a cell that said epithelial cell is characterized by being a cornea epithelial cell or a conjunctiva epithelial cell.

[Claim 5] The creation approach of the piece for transplantation according to claim 3 of a cell that said stem cell tissue is characterized by being a limbus cell.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] Especially this invention relates to the piece for an epithelial cell and the transplantation which more specifically carried out culture growth of the angle conjunctiva epithelial cell on the amnion of a cell, and its creation approach about the piece for transplantation of a cell, and its creation approach.

[0002]

[Description of the Prior Art] A cornea is an organization of the optical system which constitutes an eyeball which is located most in an outer layer and does not have a transparent blood vessel, and is contributing to acquiring good eyesight by forming a smooth front face with tear fluid. Moreover, an angle conjunctiva epithelial cell always touches the external world, and has the defense operation which protects an eyeball from beams of light, such as foreign matters, such as a microorganism of the external world, and ultraviolet rays, etc. That is, the angle conjunctiva epithelial cell has played the very important role, in order to defend the whole transparency and the whole eyeball of a cornea and to maintain homeostasis.

[0003] This cornea becomes muddy by symptoms, such as keratitis, a corneal ulcer, and punching, and transparency may be lost. The therapy by the corneal transplantation is performed to the fall of the permanent eyesight by muddiness of such a cornea. Transplantation of this cornea removes the cornea in which a patient's transparency was lost, and transplants a transparent cornea here. Transparency can be recovered by this transplantation and eyesight can be regained again.

[0004] Moreover, there is illness which cannot cope with it only by transplantation of such a cornea. For example, they are Stevens-Johnson's syndrome, eye pemphigoid, a chemistry trauma, a burn, etc. Usually, an angle conjunctiva epithelial cell repeats fission every day, and although a cell with the cell new from peeling omission and stem cell tissue which became old is reproduced, in these symptoms, it turns out that the stem cell tissue which reproduces this cornea has a failure.

[0005] The stem cell tissue which reproduces this epithelium anterius corneae is called a "limbus organization", does a ** office to the boundary parts of the iris of the eye and pewter exactly, and is in the special environment exposed to the external world. Therefore, by the symptoms mentioned above, it is thought that this stem cell tissue itself will receive and exterminate a certain failure. And that deficit part is covered by the conjunctiva epithelium which exists in the surroundings, transparency is missing, and the extreme fall of eyesight is brought about by extermination of this stem cell tissue.

[0006] In such symptoms, since the limbus is drained, the transplanted cornea is unmaintainable only by transplanting a cornea at a long period of time. Therefore, in order to aim at lasting eye surface reconstruction, it is necessary to also transplant a limbus. The transplanting method using the amnion as one of the approaches which transplants this limbus is developed (1703 the medical Asahi September, 1999 issue: p 62-65, N Engl J Med340:1697- 1999).

[0007] The amnion used for this transplanting method can be obtained from placentas, such as a gravida which carried out the cesarean section. Moreover, since this amnion has thick basement membrane, it acts as a substrate for an angle conjunctiva epithelial cell to increase and specialize. Furthermore, since an amnion does not almost have immunogenicity and it has an operation of anti-inflammation, keloplasty control, etc., the angle conjunctiva epithelia transplanted on an amnion and these stem cell tissues will be protected from the rejection of a transplantation recipient (recipient) etc.

[0008] By the transplanting method using the amnion which has such a property, the cornea tissue which did conjunctiva-ization etc. is excised first and parenchyma of cornea and sclera are exposed as shown in drawing 3. An amnion 1 is stuck on the parenchyma of cornea and sclera which were exposed for eye surface reconstruction. From the offered cornea tissue, the center-section cornea (an epithelium, a real hide, and an inner bark are included) 2 is started, it is prepared, and on the exposed amnion and parenchyma of cornea, it is transplanted and ** arrival of the perimeter of the limbus organization 3 is carried out. Thus, the transplanted limbus 3 is in the condition protected by the amnion 1 without immunogenicity, and it specializes and increases, using this amnion 1 as a substrate, and the epithelium anterius corneae is reproduced on an amnion 1. Therefore, according to this approach, it becomes long-term maintenance of the epithelium anterius corneae, and reproducible.

[0009]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, by the transplanting method using the conventional amnion, epithelialization is not appropriately performed from after the operation and the transplanted limbus, but many cases from which an eyesight improvement is not obtained also exist. Moreover, in the long-term follow-up survey of the wheel part transplantation in patients, such as Stevens-Johnson's syndrome and a cornea chemistry blemish, the achievement quotient of eye surface reconstruction was about 50%. And as for many of half non-succeeding examples, epithelialization was not obtained.

[0010] Conventionally, although the surgical treatment method of these diseases was made impossible and they are improving by 50% of transplantation success percentage by the transplanting method using an amnion, improvement in the further treatment results is desired.

[0011] Development of the transplant for on the other hand transplanting the damage part where all the layers of dermis and an epithelium suffered a loss in the Homo sapiens skin in the field of regenerative medicine advances, and it is *****. For example, the transplant and its manufacture approach for treating full-thickness defects, such as the Homo sapiens skin, are indicated by JP,10-277143,A.

[0012] This transplant carries out embedding of the fibroblast of the dermis organization origin into a human fibrin sheet, it adheres to the front face of this sheet, and epidermal tissue is made. According to such a transplant, the rate of take which was excellent when dermis was also transplanted to a missing full-thickness defect is shown.

[0013] Then, this invention is made in view of the above-mentioned technical problem, and the purpose is offering the piece for transplantation of a cell by which a higher therapy result's is planned in epithelial cells, such as an angle conjunctiva epithelial cell, using an amnion, and its creation approach.

[0014]

[Means for Solving the Problem] In order to attain the above-mentioned purpose, this invention makes epithelium stem cell tissue adhere on the amnion from which the sponge layer and the epithelium layer were removed, and is characterized by reproducing an epithelial cell by in vitro one so that this amnion front face may be covered from this stem cell tissue.

[0015] In the piece for transplantation of a cell, by proliferating an epithelial cell from the stem cell tissue to which it adhered on the amnion beforehand, so that an amnion front face may be covered, the rate of reconstruction of an epithelium is raised as compared with the transplanting method using the conventional amnion, and, according to the above-mentioned invention, a higher therapy result is planned.

[0016] Moreover, in the piece for this transplantation of a cell, since it adheres to stem cell tissue on the amnion beforehand, compared with the case where an amnion and a limbus are transplanted to an eye front face etc. according to an individual like before, it also becomes possible to shorten transplantation time amount.

[0017] In addition, what contains the epithelial cell around stem cell tissue etc. in addition to stem cell tissue is contained by the condition that stem cell tissue was offered here. Therefore, stem cell tissue is cultivated by the shape of an amnion, and what exists the epithelial cell from a provider in addition to the epithelial cell increased from stem cell tissue is contained in the increased epithelial cell.

[0018]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, the suitable operation gestalt of this invention is explained using a drawing.

[0019] [the 1st operation gestalt] -- the piece for transplantation of a cell in the 1st operation gestalt is shown in drawing 1.

[0020] As typically shown in drawing 1, the piece 10 for this transplantation of a cell consists of an amnion

12, epithelium stem cell tissue 14 which made it adhere on this amnion 12, and an epithelial cell 16 increased so that an amnion front face might be covered from this stem cell tissue.

[0021] This amnion 12 is in the maximum inside among the Amniota of a vertebrate, is direct wrap film about a germ, and has thick basement membrane. Moreover, this amnion 12 does not almost have immunogenicity and has anti-inflammatory activity etc. Thus, although an amnion 12 does not almost have immunogenicity, in order to prevent induction of the immunoreaction after transplantation more certainly, it is desirable to use the amnion of the *Homo sapiens* origin which is the same animal species in the case of the piece for transplantation of a cell to *Homo sapiens*.

[0022] However, as long as this amnion is the thing of the origin of the same kind, i.e., the *Homo sapiens* origin in the case of transplantation to *Homo sapiens*, it may not be limited to the thing in relatives, such as parents and a child, but others' thing is sufficient as it.

[0023] The amnion of the *Homo sapiens* origin can be obtained from the gravida which carried out the cesarean section, for example. Although this amnion generally has a sponge layer, a compact layer, a basement membrane layer, and an epithelium layer from a lower layer side, it is desirable to use what carried out removal processing of these in the "amnion" in this piece for transplantation of a cell, since the sponge layer and the epithelium layer are unnecessary.

[0024] The epithelium stem cell tissue 14 to which it adheres on the above-mentioned amnion 12 is a cellular structure with the capacity to reproduce an epithelial cell. As for an epithelial cell, for example, a cornea epithelial cell, a conjunctiva epithelial cell, etc. are contained here.

[0025] The limbus organization whose epithelium stem cell tissue 14 is the stem cell tissue of for example, a cornea epithelial cell is mentioned. Moreover, when an epithelial cell is a conjunctiva epithelial cell, this stem cell tissue 14 turns into stem cell tissue of the conjunctiva epithelial cell at a conjunctiva circle edge etc. In addition, localization of the above-mentioned limbus cell is carried out to the boundary of the pewter and the iris of the eye of an eyeball, it is exposed and exists in an eyeball front face, and can be obtained from a cornea provider etc.

[0026] In addition, this epithelium stem cell tissue 14 may be only stem cell tissue purely, or may contain the epithelial cell of the circumference of it, fibroblast, and a vascular endothelial cell.

[0027] Although what was offered from things other than the recipient whose epithelium stem cell tissue 14 is a patient is used, a relative may twist a provider and recipients, such as a recipient's parents and twin, may completely be others.

[0028] The epithelium stem cell tissue 14 offered by others has the desirable thing of the provider origin which the HLA type suited, in order to avoid a possibility that the rejection by immunity may arise. However, when the epithelium tubing cellular structure of the provider origin where the HLA type suited is not obtained, you may be the thing of the provider origin to which the HLA type does not conform.

[0029] Moreover, in order to prevent infection by transplantation etc., the offered organization is good to use that by which it was checked that there is no fear, such as infection, beforehand.

[0030] Furthermore, this epithelium stem cell tissue 14 has a good condition, and what may increase an epithelial cell is desirable. Moreover, when the condition of the stem cell tissue 14 is good, about [1mm square] is [as opposed to / 2cm square of size] sufficient as an amnion, although the size of the stem cell tissue 14 changes with conditions of a cell, for example.

[0031] Moreover, the epithelium stem cell tissue 14 which uses here may use two or more explants, using one explant. Moreover, it is desirable to prepare it in a configuration and to place it on an amnion as originally arranged in the living body in carrying these epithelial cell tissue 14 on an amnion.

[0032] By drawing 1, when a limbus organization is used as epithelium stem cell tissue 14, the desirable arrangement condition is shown. That is, since the limbus organization is doing localization to the boundary parts of the iris of the eye and pewter, it usually shows the case where the epithelium stem cell tissue 14 is arranged in the location equivalent to this boundary part.

[0033] About the thing which cultivates and proliferated the above-mentioned stem cell tissue 14 which made the epithelial cell 16 proliferated on the amnion 12 adhere on an amnion 12 by in vitro (in vitro) one, and the thing in the condition that the epithelial cell of the circumference of it has combined with the offered stem cell tissue, the thing containing a provider's epithelial cell other than the epithelial cell increased from the above-mentioned stem cell tissue is also contained.

[0034] Moreover, its good thing of a condition is desirable in the case of transplantation, for example, when a proliferation profile is drawn, it is desirable [the epithelial cell 16 proliferated on the amnion] that it is a

cell in a proliferation period as shows an upward primary straight line.

[0035] As above-mentioned, the front face of an amnion 12 is equipped with epithelium stem cell tissue, and the piece 10 for transplantation of a cell covered by the epithelial cell 16 is transplanted to the affected part which was exterminated or damaged to the stem cell tissue with the epithelial cell. And in the piece 10 for this transplantation of a cell, since the epithelial cell 16 is increasing from the stem cell tissue 14 so that the front face of an amnion 12 may be covered beforehand, after being transplanted to the affected part like before, as compared with the approach of proliferating an epithelial cell, it becomes possible to raise the rate of reconstruction of the epithelial tissue.

[0036] A [operation gestalt of ** 2nd] book operation gestalt explains the creation approach of the above-mentioned piece 10 for transplantation of a cell.

[0037] (1) Each process of adjustment of the adjustment amnion of an amnion is shown in drawing 2.

[0038] As shown in drawing 2, an amnion is extracted from the gravida which carried out the cesarean section of the amnion used as the substrate of the piece for transplantation of a cell in the case of *Homo sapiens* (S200).

[0039] the case where an amnion is not immediately used after extraction -- (S201) -- it can also save (S202). After performing processing for the above-mentioned preservation as this store method, it can dip in preservation liquid etc. and can also save at -80 degrees C.

[0040] The processing for saving an amnion can prepare the physiological saline which contained DMSO (dimethyl sulfoxide) by 4.2, 8.5, and 15.0% of concentration, and can be performed by subsequently dipping an amnion about 30 minutes sequentially from a solution with low DMSO concentration.

[0041] Moreover, as preservation liquid of an amnion, the above-mentioned 15%DMSO content physiological saline etc. can be used.

[0042] An amnion is pretreated in order that the amnion returned from the amnion or preservation by which extraction was carried out [above-mentioned] may make easy to remove the unnecessary epithelium layer and sponge layer which constitute an amnion (S203). The approach of this pretreatment can be processed with aqueous ammonia 10%, for example, although there is especially no limitation.

[0043] The amnion which the above-mentioned pretreatment ended is cut by suitable size if needed (S204). In for example, eye surface reconstruction, with this suitable size, the size which is about [which can fully cover the exposed eye front face / 2cm square] can be determined corresponding to the area of a transplantation part.

[0044] The cut amnion is put in by the dish plates for cell cultures (for example, 35mmphi etc.), respectively. A sponge layer and an epithelium layer are removed and, as for the amnion into which it was put in this plate, a compact layer and basement membrane are left behind (S205). And an amnion is fixed to a plate pars basilaris ossis occipitalis in the condition of having turned basement membrane upward (S206).

[0045] Although there will be especially no limitation if immobilization on the plate of an amnion is the approach of not doing big damage to an amnion especially, it can carry out by the approach which combined freezing and desiccation as follows, for example.

[0046] That is, the amnion to which a compact layer and basement membrane were left behind is completely frozen at -80 degrees C, it is again returned to a room temperature after freezing, and suction removal of the moisture in a plate is carried out. An amnion is in the condition which turned the epithelium side upward and the wrinkle was able to extend, and it is desirable to dry an amnion front face completely in sterile.

[0047] Although after desiccation can also be used as it is, you may freeze at -80 degrees C again. When it is made to freeze, the moisture which the amnion was returned at the room temperature and attached to the dish plate before use is removed, and it becomes usable.

[0048] (2) Make the epithelium stem cell tissue which extracted from the culture growth provider of the epithelial cell on an amnion adhere on an amnion, and carry out culture growth of the epithelial cell.

[0049] As for the stem cell tissue which uses here, what is in a good condition is desirable, for example, specifically, it is suitable for it to use the good stem cell in the condition of having been provided by the provider, immediately after offer. If the good stem cell tissue of such a condition is obtained, it will be made to adhere to the amnion front face fixed to the above-mentioned plate, the culture medium which is extent to which stem cell tissue does not float will be poured in, and culture will be started. However, after stem cell tissue pastes an amnion, it is desirable to increase the volume of a culture medium to extent to which

the epithelial cell which started stem cell tissue and growth is fully immersed in a culture medium. [0050] Its large thing is desirable, for example, when it is a limbus organization, as for the size of the stem cell tissue which makes it adhere to an amnion, it is desirable that it is about [1mm square] size to 2cm square of amnion. However, this size is possible for making a size change from the condition of a cellular structure etc.

[0051] Moreover, if the culture medium used in culture of the above-mentioned stem cell tissue is a culture medium which may proliferate an epithelial cell appropriately from stem cell tissue, there will be especially no limitation. For example, a SHEM culture medium etc. can be used at the time of culture initiation of stem cell tissue. Moreover, the basal medium for epithelial cell culture, for example, Medium165 culture medium etc., can be used for after epithelial cell growth initiation. In addition, the presentation of a SHEM culture medium and Medium165 culture medium is explained in full detail behind.

[0052] A blood serum required for a cell culture is added by these culture media. Although fetal calf serum (FCS) etc. can also be used for this blood serum, it is good preferably to use a recipient's blood serum the provider (donor) of stem cell tissue, or own.

[0053] In addition, when using FCS etc., centrifugal separation of the commercial item is carried out, and it is still more desirable to use what let the filter pass. Moreover, when using a Homo sapiens blood serum, it is desirable to use that from which the cell with a possibility of causing immunorejection, such as a leucocyte, with a thing, 0.22-micrometer filter, etc. which were heat-treated (for example, 56 degrees C, 30-minute about room) etc. was removed.

[0054] Moreover, the addition of a blood serum can be made into about high concentration, for example, 15%, at the time of culture initiation of stem cell tissue. On the other hand, low concentration is comparatively sufficient as after epithelial cell growth initiation, for example, it can be made into about 3%. In addition, the change stage of these culture media can be performed in the phase in which the indicator presented acidity by cell proliferation, when pH indicator etc. is added by the phase where growth of an epithelial cell was checked under the microscope, or the culture medium.

[0055] Culture is performed using an environment desirable to growth of a cell, for example, the CO2 incubator set as 37 degrees C. Moreover, when incubation period makes an amnion front face a period required for a wrap sake to it being short and plots in a graph growth of the phase where the longest is also prosperous in growth of an epithelial cell, for example, a cell, it is desirable to consider as within the limits of the proliferation period describing a primary straight line.

[0056] For example, it can consider as the period of extent exactly buried with the epithelial cell by which the plate base for culture was increased, i.e., extent which reaches confluent. the case where the good limbus organization (1mm square) of a condition is more specifically cultivated on the amnion (2cm square) fixed to the dish plate (diameter of 3.5cm) -- incubation period -- about 10 -- it is about -14 day.

[0057] (3) In a dish plate, the piece for transplantation of a cell in which the epithelial cell increased from stem cell tissue so that stem cell tissue might paste the front face by making an amnion into a substrate and the amnion front face might be covered spread is generated as a result of the recovery above-mentioned culture of the piece for transplantation of a cell. The pieces for transplantation of a cell generated here are collected by removing an amnion from a dish plate. The piece for transplantation of a cell collected here is promptly transplanted to a recipient's affected part after recovery.

[0058] A [operation gestalt of ** 3rd] book operation gestalt explains the kit for the piece creation of a cell for transplantation.

[0059] In order to create the piece for transplantation of a cell by a series of approaches shown in the operation gestalt of the above 2nd so that this creation can be carried out easily although the above-mentioned piece for transplantation of a cell can be created, you may provide as a kit with the description which indicated the creation approaches, such as required culture medium and a reagent.

[0060] For example, a culture medium required in order to cultivate the amnion and stem cell tissue which were fixed to the plate etc. can be included in this kit. Moreover, an amnion etc. may be included if needed. Thus, if stem cell tissue etc. is prepared by offering an amnion, a culture medium, etc. as a kit, it will become possible to create the piece for transplantation of a cell comparatively simple according to the above-mentioned creation approach.

[0061]

[Example] Although an example is used for below and this invention is more concretely explained to it, this invention is not limited to this example.

[0062] [Example 1] The amnion used as the substrate of the piece for adjustment transplantation of an amnion of a cell is adjusted. An amnion is extracted from the gravida which carried out the cesarean section. In saving the extracted amnion, it adjusts the processing solution for preservation. This processing solution is adjusted as 4.2 and the 8.5 or 15.0% solution which added DMSO so that it might become sterilized PBS (-) or a sterilized physiological saline with the last concentration 4.2, 8.5, and 15.0%. The solution adjusted here is put in and prepared for two or more containers, respectively.

[0063] pretreatment of the extracted amnion is performed by dipping an amnion every [30] in order with low concentration called a solution above 4.2 and 8.5 or 15.0%, respectively. After processing, when using it immediately, the following amnion epithelium is removed. On the other hand, in saving, it puts into the preservation container containing the above-mentioned 15% solution, and saves at -80 degrees C.

[0064] The dish plate for cell cultures (for example, 100mmphi) is filled with the above-mentioned 15% solution, and an amnion is moved there. An amnion is cut by the magnitude to be used and is moved to the dish plate according to individual (for example, 35mmphi), respectively. Although the extracted amnion is equipped with a sponge layer, a compact layer, basement membrane, and an epithelium sequentially from a lower layer, the sponge layer of the lowest layer is removed using a pincette. After a sponge layer is removed, this amnion is dipped in aqueous ammonia 10%, and it puts for 30 minutes at a room temperature.

[0065] Next, the epithelium of the maximum upper layer is removed from an amnion using a scraper. After completing removal of an epithelium, aqueous ammonia is attracted 10% and it removes. Then, sterilized PBS is poured into a dish plate and an amnion is washed.

[0066] In order to carry out growth culture of the epithelial cell by making the amnion after washing into a substrate, this amnion is stuck on the bottom of a dish plate, and it fixes. This attachment immobilization is performed to extent to which an amnion does not surface, when culture medium is added behind.

[0067] An amnion is frozen and dried in order to stick an amnion on a plate pars basilaris ossis occipitalis. By the approach of passing through two freezings, first, the amnion after the above-mentioned PBS washing is put on -80 degrees C, and, specifically, is frozen completely.

[0068] Then, the amnion frozen on the culture previous day of an epithelial cell is returned to a room temperature, and the moisture in a plate is sucked up with an aspirator. After an aspirator removes moisture, the upper layer is turned upward, an amnion is extended with pincettes, and the wrinkle of an amnion is taken. The air dried of the fan is followed and carried out in the condition for 1 hour or more, opening the lid of a dish plate within a clean bench. If it checks that the upper side of an amnion has got dry completely, -80 degrees C will be frozen again. It returns in front for about 1 hour to be used at a room temperature, and it is used after removing the moisture attached to the dish plate.

[0069] In addition, when it fixes the above-mentioned amnion to a plate base, the 2nd freezing process can also be skipped.

[0070] [Example 2] It collects blood from the provider of the creation limbus organization of the piece for transplantation of a cell using the limbus organization offered by the parents of a transplantation recipient, twin, etc., and a blood serum is separated. 56 degrees C, the separated blood serum is heat-treated for 30 minutes, and is inactivated. This blood serum is added to a SHEM culture medium, and the SHEM culture medium containing a blood serum is adjusted 15%. A part of culture medium adjusted here is beforehand put into a container, and a limbus organization is extracted from a provider. The limbus organization which extracted is promptly supplied to the container of said entering a culture medium.

[0071] A limbus organization is laid on the amnion fixed to the above-mentioned dish plate, the above-mentioned blood serum content SHEM culture medium is poured in so that an organization may not float, and it incubates at 37 degrees C. If an organization pastes an amnion by this incubation, a culture medium will be added and cultivated further.

[0072] By culture, culture medium is changed into blood serum content 165 culture medium 3% in the place where growth of an epithelial cell was observed around the organization. In addition, pH indicator contained in a culture medium can also detect observation of epithelial cell growth by showing acidity.

[0073] Culture is continued after changing into the 3% blood serum content 165 above-mentioned culture medium, exchanging this culture medium periodically. In about ten - 14 days, culture is performed until the pars basilaris ossis occipitalis of a dish plate becomes confluent.

[0074] The piece for transplantation of a cell which an epithelial cell increases from the limbus organization which made it adhere on an amnion, and uses an amnion as basement membrane, and is covered by the cornea epithelial cell in this front face, and has a limbus organization is created as a result of the above-

mentioned culture.

[0075] In addition, the presentation of the culture medium used by this example is shown in Table 1.

[0076]

[Table 1]

<SHEM culture medium> Presentation Acquisition place A content / 1l. -----

-----HEPES content dull tortoiseshell strange method Eagle's medium GibcoBRL 15.6g (D-MEM/F12) NaHCO3 Wako Pure Chem (at the time of use concentration) 2.5g insulin (human recombinant SIGMA company (at time of use concentration) 5mg expressed in E.coli) Homo sapiens epidermal growth factor GibcoBRL (at the time of use concentration) 10mg (Homo sapiens - EGF)

A cholera toxin GibcoBRL (at the time of use concentration) 1mg dimethyl sulfoxide (DMSO) SIGMA company 5ml antibiotic (for example, the benzylpenicillin --) Optimum dose streptomycin <165 culture media> A presentation Acquisition place A content / 1l. -----

Medium165 culture medium KURABO (basal medium for Homo sapiens cornea epithelial cell culture) Insulin SIGMA company (at the time of use concentration) 5mg Homo sapiens - EGF GibcoBRL (at the time of use concentration) 1mg hydrocortisone (at the time of use concentration) 0.18mg (Homo sapiens cornea epithelial cell growth additive (HCGS) use)

[0077] [Example 3] Each process in creation of the piece for creation transplantation of the piece for transplantation of a cell using the limbus organization offered by others of a cell is performed by a series of above-mentioned processes. Here, the blood serum of the recipient origin instead of the donor origin is used for the blood serum added by culture medium.

[0078] That is, the blood serum added in a 15% blood serum addition SHEM culture medium and 3% blood serum addition 165 culture medium uses the blood serum extracted from the recipient. In addition, this blood serum is inactivated and used by dissociating from the blood extracted from the recipient like the above, and performing heat treatment for 56 degrees C and 30 minutes after this blood serum separation.

[0079] Thus, even if it is the case where the blood serum from a provider is not obtained, the piece for transplantation of a cell can be created with a recipient's blood serum.

[0080] [Example 4] The epithelium anterius corneae which carried out conjunctiva-ization etc. is removed from the eye front face of the transplantation patient of the piece for transplantation of a cell, and parenchyma of cornea is exposed. On the other hand, the piece for transplantation of a cell created as above-mentioned removes and collects amnions from a plate with pincettes etc.

[0081] The collected piece for transplantation of a cell is transplanted so that an amnion may contact on the exposed parenchyma of cornea. Moreover, the limbus organization on an amnion is stationed so that the location of the original limbus which is the boundary of pewter and the iris of the eye may be corresponded to. After arrangement, a physiological saline etc. washes the piece of a cell transplanted to the eye front face, and it is sewn on after washing.

[0082] In addition, when the above-mentioned transplantation was carried out to about eight recipients, fixing of an epithelial cell was observed at an early stage.

[0083]

[Effect of the Invention] According to the piece for transplantation of this invention of a cell the above passage, the rate of reconstruction of the epithelial tissue can be raised and a higher curative effect can be expected. Moreover, if stem cell tissue is obtained even when offer of epithelial tissue, such as epithelium anterius corneae, is insufficient, it will also become possible by making it increase on an amnion using this part to reproduce epithelial tissue, such as two or more epithelium anterius corneae.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the whole piece configuration for transplantation of this operation gestalt of a cell.

[Drawing 2] It is the flow chart which shows each process of amnion adjustment.

[Drawing 3] It is drawing showing each process in the conventional amnion transplantation approach.

[Description of Notations]

10 The piece for transplantation of a cell, 12 An amnion, 14 Stem cell tissue, 16 Epithelial cell.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

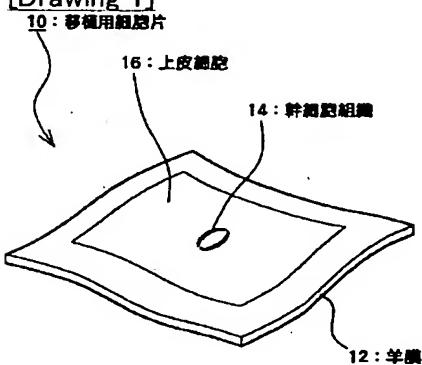
1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2. **** shows the word which can not be translated.

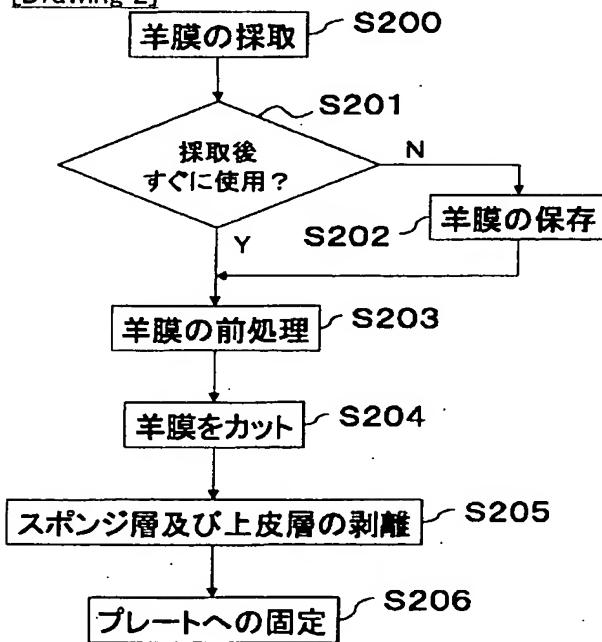
3. In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

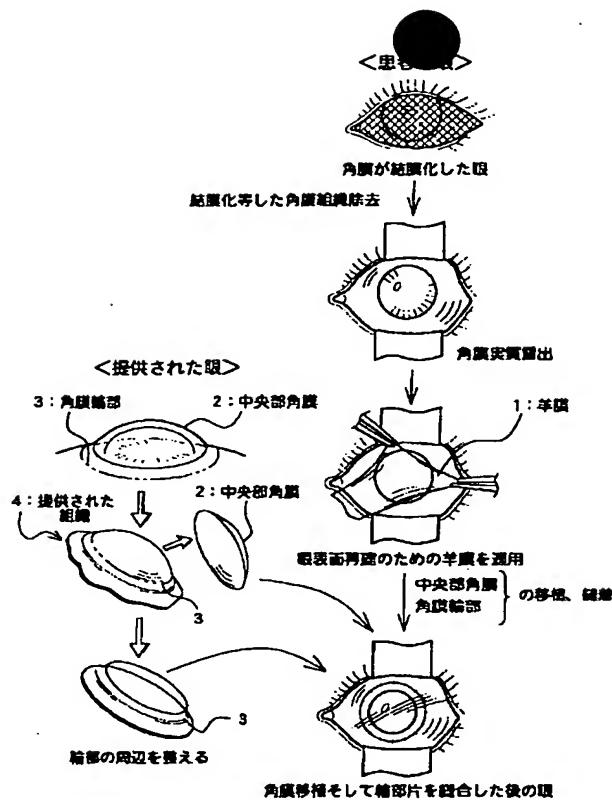
[Drawing 1]



[Drawing 2]



[Drawing 3]



[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001-161353
(P2001-161353A)

(43)公開日 平成13年6月19日 (2001.6.19)

(51)Int.Cl.
C 12 N 5/06
A 61 F 9/007

識別記号

F I
C 12 N 5/00
A 61 F 9/00テマコード(参考)
E 4 B 0 6 5
5 9 0

審査請求 未請求 請求項の数5 OL (全8頁)

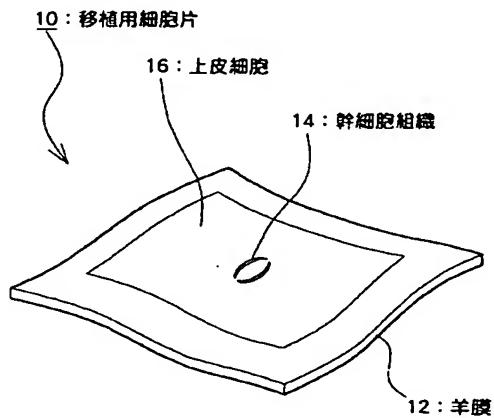
(21)出願番号 特願平11-349705
(22)出願日 平成11年12月9日 (1999.12.9)(71)出願人 599173088
有限会社ジャパン・オフサルミック・コン
サルタンツ
千葉県船橋市西船5丁目26番7号
(72)発明者 島▲崎▼潤
東京都目黒区下目黒3-7-28-301
(72)発明者 坪田一男
千葉県船橋市西船5丁目26番7号
(74)代理人 100099623
弁理士 奥山尚一 (外2名)
Fターム(参考) 4B065 AA93X BB23 CA44

(54)【発明の名称】移植用細胞片及びその作成方法

(57)【要約】

【課題】 上皮の再建率の高い移植用細胞片及びその作成方法を提供する。

【解決手段】 本移植用細胞片10は、羊膜12と、この羊膜12上に付着させた上皮幹細胞組織14と、この幹細胞組織から羊膜表面を覆うように増殖した上皮細胞16とから構成される。また、この移植用細胞片10の作成は、羊膜12をディッシュプレートに固定し、羊膜12上に上皮幹細胞組織14を接着させ、その状態で培養を行う。この培養により、幹細胞組織14から上皮細胞16が増殖し、羊膜12の表面は、上皮細胞16により覆われる。これにより、羊膜12の表面に上皮幹細胞組織14が付着し、さらにその表面が増殖した上皮細胞16で覆われた移植用細胞片10が作出される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 スポンジ層と上皮層とが取り除かれた羊膜と、

前記羊膜の表面に付着された上皮幹細胞組織と、前記幹細胞組織より該羊膜表面を覆うようにインビトロで増殖させた上皮細胞と、を含む移植用細胞片。

【請求項2】 前記上皮細胞が、角膜上皮細胞又は結膜上皮細胞であることを特徴とする請求項1に記載の移植用細胞片。

【請求項3】 スポンジ層と上皮層とが除去された羊膜を調整する工程と、

前記羊膜に上皮幹細胞組織を付着させる工程と、前記羊膜上に該上皮細胞を増殖させる工程と、を有する移植用細胞片の作成方法。

【請求項4】 前記上皮細胞が、角膜上皮細胞又は結膜上皮細胞であることを特徴とする請求項3に記載の移植用細胞片の作成方法。

【請求項5】 前記幹細胞組織が、角膜輪部細胞であることを特徴とする請求項3に記載の移植用細胞片の作成方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、移植用細胞片及びその作成方法に関し、特に、上皮細胞、より具体的には、角結膜上皮細胞を羊膜上に培養増殖させた移植用細胞片及びその作成方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 角膜は、眼球を構成する光学系の最も外層にあり、透明な血管のない組織であって、涙液と共に平滑な表面を形成することにより良好な視力を得ることに貢献している。また、角結膜上皮細胞は常に外界と接し、外界の微生物などの異物、紫外線などの光線などから眼球を守る防御作用を持っている。すなわち、角結膜上皮細胞は、角膜の透明性と眼球全体を防御し恒常性を維持するために極めて重要な役割を果たしている。

【0003】 この角膜は、例えば、角膜炎、角膜潰瘍、穿孔等の病態により濁り、透明性が失われてしまう場合がある。このような角膜の濁りによる永続的な視力の低下に対しては、角膜移植による治療が行われている。この角膜の移植は、患者の透明性が失われた角膜を取り除き、ここに透明な角膜を移植する。この移植により透明性が回復し、再び視力を取り戻すことができる。

【0004】 また、このような角膜の移植だけでは対処できない病気がある。例えば、スティーブンス・ジョンソン症候群、眼類天疱瘍、化学外傷、熱傷などである。通常、角結膜上皮細胞は、毎日分裂を繰り返し、古くなった細胞は、はがれ落ち、幹細胞組織から新たな細胞が再生されるが、これらの病態では、この角膜を再生させる幹細胞組織に障害があることがわかってきている。

【0005】 この角膜上皮を再生させる幹細胞組織は

「角膜輪部組織」と呼ばれ、ちょうど黒目と白目の境界部分に限局し、外界に露出された特殊な環境にある。そのため、上述した病態では、この幹細胞組織自体がなんらかの障害を受けて根絶してしまうと考えられている。そして、この幹細胞組織の根絶により、その欠損部分は周囲に存在する結膜上皮で覆われ、透明性に欠け、視力の極端な低下がもたらされる。

【0006】 このような病態では、角膜輪部が枯渇しているため、単に角膜を移植するだけでは移植された角膜を長期に維持できない。そのため、恒久的な眼表面再建を図るために角膜輪部をも移植する必要がある。この角膜輪部を移植する方法の一つとして、羊膜を用いた移植法が開発されている（メディカル朝日1999年9月号：p 62～65、N Engl J Med 340：1697～1703、1999）。

【0007】 この移植法に用いられる羊膜は、帝王切開した妊婦等の胎盤から得ることができる。また、この羊膜は、厚い基底膜をもつことから、角結膜上皮細胞が増殖、分化するための基質として作用する。さらに、羊膜は免疫原性がほとんどなく、抗炎症、瘢痕形成抑制などの作用を併せ持つことから、羊膜上に移植される角結膜上皮やこれらの幹細胞組織は移植受容者（レシピエント）の拒絶反応等から保護されることになる。

【0008】 このような性質を有する羊膜を用いた移植法では、図3に示す通り、先ず、結膜化等した角膜組織を切除し、角膜実質及び強膜が露出される。露出された角膜実質及び強膜に、眼表面再建のため羊膜1が張り付けられる。提供された角膜組織からは、中央部角膜（上皮・実皮・内皮を含む）2が切り出され、角膜輪部組織3の周囲が整えられて、露出された羊膜および角膜実質上に移植、接着される。このように移植された角膜輪部3は、免疫原性のない羊膜1に保護された状態で、この羊膜1を基質として分化、増殖し、羊膜1上で角膜上皮が再生される。そのため、この方法によれば、角膜上皮の長期的な維持、再生が可能となる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】 しかし、従来の羊膜を用いた移植法では、術後、移植された角膜輪部から適切に上皮化が行われず、視力改善が得られない症例も多数存在する。また、スティーブンス・ジョンソン症候群や角膜化学傷などの患者における輪部移植の長期の追跡調査では、眼表面再建の達成率が約50%であった。そして、半数の非成功例の多くは、上皮化が得られなかった。

【0010】 従来、これら疾患は、外科的治療法は不可能とされていたが、羊膜を用いた移植法では移植成功率50%までに向上されてはいるが、さらなる治療成績の向上が望まれている。

【0011】 一方、再生医学の分野においては、ヒト皮膚において真皮、上皮の全層が欠損した損傷部位を移植

するための移植片の開発が進められている。例えば、特開平10-277143号公報には、ヒト皮膚等の全層欠損創を治療するための移植片及びその製造方法が記載されている。

【0012】この移植片は、ヒトのフィブリンシート内に真皮組織由来の線維芽細胞を包埋し、表皮組織をこのシートの表面に付着して作られる。このような移植片によれば、真皮をも欠損している全層欠損創に移植した場合に優れた生着率が示されている。

【0013】そこで、本発明は上記課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、羊膜を用いて角結膜上皮細胞などの上皮細胞において、より高い治療成果が図られる移植用細胞片及びその作成方法を提供することである。

【0014】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明は、スponジ層及び上皮層が除かれた羊膜上に上皮幹細胞組織を付着させ、この幹細胞組織から該羊膜表面を覆うように上皮細胞をインビトロで再生させることを特徴とする。

【0015】上記発明によれば、移植用細胞片において、予め羊膜上に付着された幹細胞組織から上皮細胞を羊膜表面を覆うように増殖させておくことにより、従来の羊膜を用いた移植法に比して上皮の再建率を向上させ、より高い治療成果が図られる。

【0016】また、本移植用細胞片では、予め羊膜上に幹細胞組織が付着されているため、従来のように羊膜、角膜輪部を個別に眼表面などに移植する場合に比べ、移植時間を短縮化させることも可能となる。

【0017】尚、ここで幹細胞組織は、提供された状態により、幹細胞組織以外に幹細胞組織周辺の上皮細胞などを含むものも含まれる。そのため、羊膜状で幹細胞組織を培養し、増殖した上皮細胞には、幹細胞組織から増殖した上皮細胞以外に、提供者からの上皮細胞を存在するものも含まれる。

【0018】

【発明の実施の形態】以下、本発明の好適な実施形態を図面を用いて説明する。

【0019】[第1の実施形態]第1の実施形態における移植用細胞片を図1に示す。

【0020】図1に模式的に示すように、本移植用細胞片10は、羊膜12と、この羊膜12の上に付着させた上皮幹細胞組織14と、この幹細胞組織から羊膜表面を覆うように増殖した上皮細胞16とから構成される。

【0021】この羊膜12は、脊椎動物の羊膜類のうち最内側にあって胚を直接覆う膜であり、厚い基底膜を有する。また、この羊膜12は、免疫原性がほとんどなく、抗炎症作用などを有している。このように羊膜12は免疫原性がほとんどないが、移植後の免疫反応の惹起をより確実に防止するためには、ヒトへの移植用細胞片

の場合には、同じ動物種であるヒト由来の羊膜を用いることが好ましい。

【0022】但し、この羊膜は、同種由来、すなわちヒトへの移植の場合にはヒト由来のものであれば、親、子供など血縁関係にあるものに限定されず他人のものでもよい。

【0023】ヒト由来の羊膜は、例えば、帝王切開した妊婦から得ることができる。この羊膜は、一般に下層側から、スponジ層、緻密層、基底膜層、上皮層とを有するが、この移植用細胞片における「羊膜」では、スponジ層と上皮層とは不要であるため、これらを除去処理したものを用いることが好ましい。

【0024】上記羊膜12の上に付着される上皮幹細胞組織14は、上皮細胞を再生させる能力がある細胞組織である。ここで上皮細胞は、たとえば、角膜上皮細胞、結膜上皮細胞などが含まれる。

【0025】上皮幹細胞組織14は、たとえば、角膜上皮細胞の幹細胞組織である角膜輪部組織などが挙げられる。また、上皮細胞が結膜上皮細胞である場合には、この幹細胞組織14は、結膜円縁部等にある結膜上皮細胞の幹細胞組織となる。なお、上記角膜輪部細胞は、眼球の白目と黒目の境に局在し、眼球表面に露出して存在し、角膜提供者などから得ることができる。

【0026】なお、この上皮幹細胞組織14は、純粋に幹細胞組織のみであっても、その周辺の上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞を含んでいるものであってもよい。

【0027】上皮幹細胞組織14は、患者であるレシピエント以外のものから提供されたものが用いられるが、提供者は、レシピエントの親、兄弟など、また、レシピエントとは血縁関係のない全く他人であってもよい。

【0028】他人から提供された上皮幹細胞組織14は、免疫による拒絶反応が生じるおそれを回避するためには、HLAタイプの適合した提供者由来のものが好ましい。しかし、HLAタイプが適合した提供者由来の上皮幹細胞組織が得られない場合には、HLAタイプが適合していない提供者由来のものであってもよい。

【0029】また、移植による感染などを防止するために、提供された組織は予め感染などのおそれがないことが確認されたものを用いることがよい。

【0030】さらに、この上皮幹細胞組織14は、状態がよく、上皮細胞を増殖し得るものが好ましい。また幹細胞組織14のサイズは、細胞の状態により異なるが、例えば、幹細胞組織14の状態がよい場合には、羊膜が2cm²のサイズに対して、例えば1mm²程度でもよい。

【0031】また、ここで用いる上皮幹細胞組織14は、一組織片を用いても、複数の組織片を用いてもよい。また、これら上皮幹細胞組織14を、羊膜上に載せる場合には、生体内で本来配置しているように形状に整え

て羊膜上に置くことが望ましい。

【0032】図1では、上皮幹細胞組織14として角膜輪部組織を用いた場合に望ましい配置状態を示している。すなわち、通常、角膜輪部組織は、黒目と白目の境界部分に局在していることから、この境界部分に相当する位置に上皮幹細胞組織14を配置させた場合を示している。

【0033】羊膜12上に増殖させた上皮細胞16は、羊膜12の上に付着させた上記幹細胞組織14をインビトロ(*in vitro*)で培養して増殖させたもの、また、提供された幹細胞組織にその周辺の上皮細胞が結合している状態のものについては、上記幹細胞組織から増殖した上皮細胞のほかに提供者の上皮細胞を含むものも含まれる。

【0034】また、羊膜上で増殖させた上皮細胞16は、移植の際に状態のよいものであることが望ましく、例えば、増殖曲線を描いたときに右肩上がりの一次直線を示すような増殖期にある細胞であることが好ましい。

【0035】上記の通り、羊膜12の表面に上皮幹細胞組織を備え、上皮細胞16で覆われた移植用細胞片10は、上皮細胞とともにその幹細胞組織までも根絶又は損傷したような患部に移植される。そして、本移植用細胞片10では、予め羊膜12の表面を覆うように幹細胞組織14から上皮細胞16が増殖しているため、従来のように患部に移植された後に上皮細胞を増殖させる方法に比較して、上皮組織の再建率を向上させることが可能となる。

【0036】[第2の実施形態]本実施形態では、上記移植用細胞片10の作成方法について説明する。

【0037】(1) 羊膜の調整

羊膜の調整の各工程については、図2に示す。

【0038】図2に示すように、移植用細胞片の基質となる羊膜は、ヒトの場合には帝王切開した妊婦などから羊膜が採取される(S200)。

【0039】羊膜は採取後すぐに使用しない場合には(S201)、保存することもできる(S202)。この保存方法としては、上記保存のための処理を行った後、保存液などに浸して-80°Cで保存することもできる。

【0040】羊膜を保存するための処理は、例えば、4.2.8.5.15.0%の濃度でDMSO(ジメチルスルホキシド)を含有した生理食塩水を準備し、次いで、DMSO濃度の低い溶液から順に羊膜を30分程度浸すことにより行うことができる。

【0041】また羊膜の保存液としては、上記15%DMSO含有生理食塩水などを用いることができる。

【0042】上記採取された羊膜又は保存から戻された羊膜は、羊膜を構成する不必要な上皮層及びスponジ層を剥がし易くするために、羊膜が前処理される(S203)。この前処理の方法は、特に限定はないが、例え

ば、10%アンモニア水で処理することができる。

【0043】上記前処理が終了した羊膜は、必要に応じて、適切なサイズに切断される(S204)。この適切なサイズとは、例えば、眼表面再建の場合には、露出している眼表面を十分に覆うことが可能な2cm平方程度のサイズなど、移植部位の面積に対応して決定することができる。

【0044】切断された羊膜は、それぞれ細胞培養用のディッシュプレート(例えば、35mmφなど)に入れられる。このプレート内に入れられた羊膜はスponジ層と上皮層とが剥がされ、緻密層と、基底膜とが残される(S205)。そして、基底膜を上向きにした状態で、羊膜はプレート底部に固定される(S206)。

【0045】羊膜のプレートへの固定は、特に、羊膜に大きな損傷を与えない方法であれば特に限定はないが、例えば、以下のように凍結と乾燥を組み合わせた方法で実施することができる。

【0046】すなわち、緻密層及び基底膜が残された羊膜を、-80°Cで完全に凍結させ、凍結後、室温に再度戻され、プレート内の水分が吸引除去される。羊膜は、上皮側が上向きにされて皺が広げられた状態で、無菌的に羊膜表面を完全に乾燥させることが好ましい。

【0047】乾燥後は、そのまま使用することもできるが、再度-80°Cに凍結してもよい。凍結させた場合には、使用前に羊膜は室温に戻され、ディッシュプレートについた水分が除去されて使用可能となる。

【0048】(2) 羊膜上での上皮細胞の培養増殖
提供者から採取した上皮幹細胞組織を羊膜上に付着させ、上皮細胞を培養増殖させる。

【0049】具体的には、ここで用いる幹細胞組織は、状態がよいものが好ましく、例えば、提供者から提供された状態のよい幹細胞を提供直後に使用することが好適である。このような状態のよい幹細胞組織が得られたら、上記プレートに固定された羊膜表面に付着させ、幹細胞組織が浮遊しない程度の培地を注入し、培養を開始する。但し、幹細胞組織が羊膜に接着した後は、培地の液量を幹細胞組織や増殖を開始した上皮細胞が十分に培地に浸る程度まで増やすことが好ましい。

【0050】羊膜に付着させる幹細胞組織のサイズは、大きめであることが好ましく、例えば、角膜輪部組織の場合には、2cm平方の羊膜に対して1mm平方程度のサイズであることが好ましい。しかし、このサイズは、細胞組織の状態などから大小変更させることは可能である。

【0051】また、上記幹細胞組織の培養において用いられる培地は、幹細胞組織から上皮細胞を適切に増殖させ得る培地であれば、特に限定はない。例えば、幹細胞組織の培養開始時には、SHEM培地などを用いることができる。また、上皮細胞増殖開始後は、上皮細胞培養用の基礎培地、例えば、Medium 165培地などを用いる

ことができる。なお、S H E M 培地及びMedium 1 6 5 培地の組成については、後に詳述する。

【0052】これら培地には、細胞培養に必要な血清が添加される。この血清は、ウシ胎児血清（F C S）などを用いることもできるが、好ましくは、幹細胞組織の提供者（ドナー）又はレシピエント自身の血清を用いることがよい。

【0053】なお、F C Sなどを用いる場合には、市販品を遠心分離し、さらに、フィルターを通したもの用いることが好ましい。また、ヒト血清を用いる場合には、熱処理（例えば、5 6 ℃、30分間程度）したものや0. 22 μm フィルター等により白血球などの免疫拒絶反応を惹起するおそれのある細胞などが除去されたものを用いることが好ましい。

【0054】また血清の添加量は、幹細胞組織の培養開始時には、高濃度、例えば15%程度とすることができる。一方、上皮細胞増殖開始後は、比較的の低濃度でもよく、例えば、3%程度とすることができる。なお、これら培地の切り替え時期は、顕微鏡下で上皮細胞の増殖が確認された段階又は、培地にpHインディケータなどが添加されている場合には、細胞増殖によりインディケータが酸性を呈した段階で行うことができる。

【0055】培養は、細胞の増殖に好ましい環境、例えば、37℃に設定されたCO₂インキュベーターなどを用いて行う。また、培養期間は、短くとも羊膜表面を覆うために必要な期間とし、最長でも上皮細胞の増殖が盛んな段階、例えば、細胞の増殖をグラフにプロットした際に一次直線を描く増殖期の範囲内とすることが好ましい。

【0056】例えば、培養用のプレート底面が増殖された上皮細胞でちょうど埋まる程度、すなわち、コンフルエントに達する程度の期間とすることができます。より具体的には、状態のよい角膜輪部組織（1mm²）を、ディッシュプレート（直径3. 5 cm）に固定された羊膜（2 cm²）上で培養した場合には、培養期間は、およそ10～14日程度とすることができます。

【0057】（3）移植用細胞片の回収

上記培養の結果、ディッシュプレート内には、羊膜を基質として、その表面に幹細胞組織が接着され、また、その羊膜表面を覆うように幹細胞組織から増殖した上皮細胞が広がった移植用細胞片が生成される。ここで生成された移植用細胞片は、羊膜をディッシュプレートから剥がすことにより回収される。ここで回収された移植用細胞片は、回収後速やかにレシピエントの患部に移植される。

【0058】[第3の実施形態]本実施形態では、移植用細胞片作成用キットについて説明する。

【0059】上記第2の実施形態に示した一連の方法により、上記移植用細胞片を作成することができるが、この作成を容易に実施し得るように移植用細胞片を作成す

るために、必要な培養液、試薬等及び作成方法を記載した説明書などとともにキットとして提供してもよい。

【0060】例えば、このキットには、プレートに固定された羊膜、幹細胞組織を培養するために必要な培地などを含めることができる。また、必要に応じて、羊膜なども含めてよい。このように羊膜や培地などがキットとして提供されることにより、幹細胞組織などを準備すれば、上記作成方法に従って比較的簡便に移植用細胞片を作成することが可能となる。

【0061】

【実施例】以下に、本発明を実施例を用いてより具体的に説明するが、本発明は本実施例に限定されるものではない。

【0062】[実施例1] 羊膜の調整

移植用細胞片の基質となる羊膜を調整する。帝王切開した妊婦などから羊膜を採取する。採取した羊膜を保存する場合には保存用の処理溶液を調整する。この処理溶液は、滅菌済みP B S（-）又は滅菌済み生理食塩水に最終濃度4. 2, 8. 5, 15. 0%となるようにD M S Oを添加した、4. 2, 8. 5, 15. 0%溶液として調整される。ここで調整された溶液をそれぞれ複数の容器に入れて準備する。

【0063】採取した羊膜の前処理は、上記4. 2, 8. 5, 15. 0%溶液という濃度の低い順でそれぞれ30分ずつ羊膜を浸すことにより行う。処理後、すぐに使用する場合は次の羊膜上皮の除去を行う。一方、保存する場合には、上記15%溶液を含む保存容器に入れて、-80℃で保存する。

【0064】細胞培養用のディッシュプレート（例えば、100 mm²）に上記15%溶液を注ぎ、そこに羊膜を移す。羊膜は、使用する大きさに切断され、それぞれ個別のディッシュプレート（例えば、35 mm²）に移される。採取された羊膜には、下層から順にスponジ層、緻密層、基底膜、上皮を備えるが、このうち最下層のスponジ層をピンセットを用いて剥がす。スponジ層が剥がされた後、この羊膜を10%アンモニア水に浸し、室温で30分間静置する。

【0065】次に、羊膜から最上層の上皮をスクリーパーを用いて剥がす。上皮の除去が終了後、10%アンモニア水を吸引し除去する。その後、ディッシュプレートに滅菌済みP B Sを注入し、羊膜を洗浄する。

【0066】洗浄後の羊膜を基質として上皮細胞を増殖培養するために、この羊膜をディッシュプレートの底に張り付けて、固定する。この張付け固定は、後に培養液を添加したときに羊膜が浮上しない程度に行う。

【0067】羊膜をプレート底部に張り付けるためには、羊膜を凍結及び乾燥させる。具体的には、2回の凍結を経る方法では、先ず、上記P B S洗浄後の羊膜を-80℃に置き、完全に凍結させる。

【0068】その後、上皮細胞の培養前日に凍結した羊

膜を室温に戻し、プレート内の水分をアスピレータで吸い取る。水分をアスピレータで除去した後、羊膜を上層を上向きにして、ピンセットで広げて羊膜の皺を取る。その状態で、クリーンベンチ内でディッシュプレートの蓋を開いたまま、ファンをつけて1時間以上風乾させる。羊膜の上層面が完全に乾いた事を確認したら、再度-80℃に凍結させる。使用する1時間位前に室温に戻し、ディッシュプレートについた水分を取り除いた後、使用する。

【0069】なお、上記羊膜をプレート底面に固定する場合、2度目の凍結工程を省略することもできる。

【0070】【実施例2】移植受容者の親、兄弟などから提供された角膜輪部組織を用いた移植用細胞片の作成角膜輪部組織の提供者から採血し、血清を分離する。分離された血清を、56℃、30分間、熱処理して不活性化する。この血清をSHEM培地に添加し、15%血清入りSHEM培地を調整する。ここで調整された培地の一部を予め容器に入れ、提供者から角膜輪部組織を採取する。採取した角膜輪部組織を前記培地入りの容器に速やかに投入する。

【0071】角膜輪部組織を上記ディッシュプレートに

< S H E M 培地 >

組成	入手先	含有量/11
<hr/>		
H E P E S 含有ダルベッコウ 変法イーグル培地 (D-MEM/F12)	GibcoBRL社	15.6g
N a H C O 3 インスリン (human recombinant expressed in E.coli)	和光純薬 SIGMA社	(使用時濃度) 2.5g (使用時濃度) 5mg
ヒト上皮細胞成長因子 (ヒト-E G F)	GibcoBRL社	(使用時濃度) 10mg
コレラ毒素 ジメチルスルホキシド(D M S O)	GibcoBRL社 SIGMA社	(使用時濃度) 1mg 5ml
抗生物質(例えば、ベンジルペニシリン、 ストレプトマイシン)		適量
<hr/>		
< 165 培地 >		
組成	入手先	含有量/11
<hr/>		
Medium 165 培地 (ヒト角膜上皮細胞培養用基礎培地)	KURABO	
インスリン ヒト-E G F	SIGMA社 GibcoBRL社	(使用時濃度) 5mg (使用時濃度) 1mg

固定された羊膜上に載置し、組織が浮かないように上記血清含有SHEM培地を注入して、37℃でインキュベートする。このインキュベートにより組織が羊膜に接着したら、さらに培地を追加して培養する。

【0072】培養により、組織の周囲に上皮細胞の増殖が観察されたところで、培養液を3%血清含有165培地に変更する。なお、上皮細胞増殖の観察は、例えば培地に含まれるpHインディケータが酸性を示していることにより検知することもできる。

【0073】上記3%血清含有165培地に変更後、この培地を定期的に交換しながら、培養を継続する。培養は、およそ10~14日間で、ディッシュプレートの底部がコンフルエントになるまで行う。

【0074】上記培養の結果、羊膜上に付着させた角膜輪部組織から上皮細胞が増殖して、羊膜を基底膜としこの表面を角膜上皮細胞で覆われ、かつ角膜輪部組織を有する移植用細胞片が作成される。

【0075】なお、本実施例で用いた培地の組成を表1に示す。

【0076】

【表1】

ヒドロコルチゾン

(ヒト角膜上皮細胞増殖添加剤(HCGS)使用)

(使用時濃度) 0.18mg

【0077】[実施例3] 他人から提供された角膜輪部組織を用いた移植用細胞片の作成

移植用細胞片の作成における各工程は、上述の一連の工程により行われる。ここでは、培養液に添加される血清をドナー由来ではなく、レシピエント由来の血清を用いている。

【0078】すなわち、15%血清添加SHEM培地及び3%血清添加165培地において、添加される血清はレシピエントから採取した血清を用いる。なお、この血清は、上記と同様に、レシピエントから採取した血液から分離し得られ、この血清分離後、56℃、30分間、熱処理を行うことにより不活性化されて使用される。

【0079】このように提供者からの血清が得られない場合であっても、レシピエントの血清により、移植用細胞片を作成することができる。

【0080】[実施例4] 移植用細胞片の移植

患者の眼表面から結膜化した角膜上皮を除去し、角膜実質を露出させる。一方、上記の通り作成された移植用細胞片は、ピンセットなどでプレートから羊膜を剥がして回収する。

【0081】回収した移植用細胞片は、露出した角膜実質上に羊膜が接触するように移植する。また羊膜上の角膜輪部組織は、白目と黒目との境界である本来の角膜輪部の位置に当たるように配置する。配置後、眼表面に移

植された細胞片を生理食塩水などで洗浄し、洗浄後、縫着する。

【0082】なお、上記移植を8名程度のレシピエントに対して実施したところ、早期に上皮細胞の定着が観察された。

【0083】

【発明の効果】以上の通り、本発明の移植用細胞片によれば、上皮組織の再建率を向上させることができ、より高い治療効果が期待できる。また、角膜上皮などの上皮組織の提供が不足している場合でも、幹細胞組織が得られれば、この一部を用いて羊膜上で増殖させることにより、複数の角膜上皮などの上皮組織を再生させることも可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本実施形態の移植用細胞片の全体構成を示す図である。

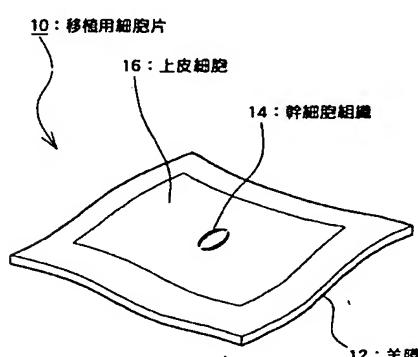
【図2】 羊膜調整の各工程を示すフローチャートである。

【図3】 従来の羊膜移植方法における各工程を示す図である。

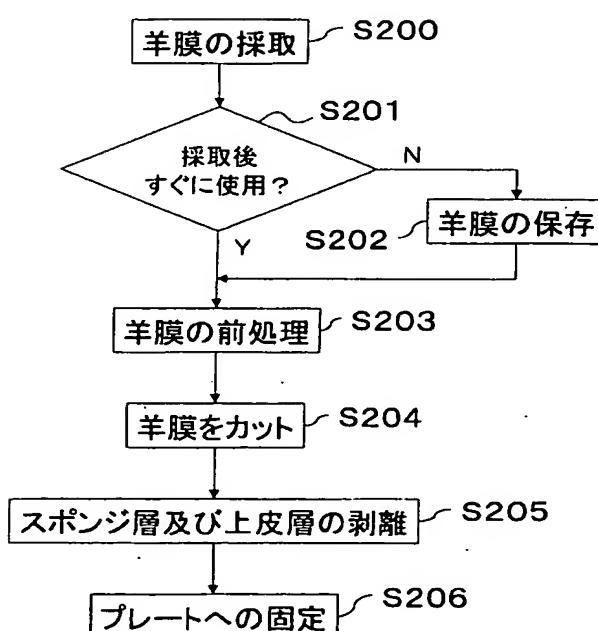
【符号の説明】

10 移植用細胞片、12 羊膜、14 幹細胞組織、16 上皮細胞。

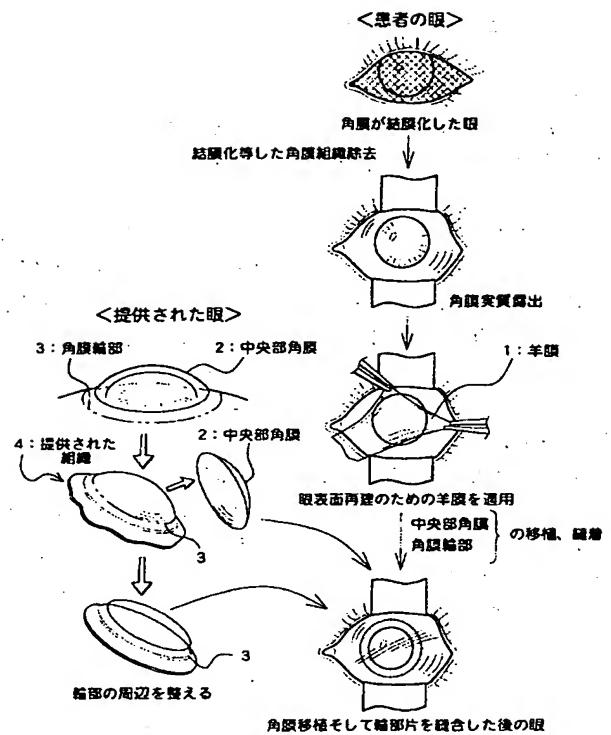
【図1】



【図2】



【図3】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.